

# EUROPEAN PATENT OFFICE

## Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 04334396  
PUBLICATION DATE : 20-11-92

APPLICATION DATE : 09-05-91  
APPLICATION NUMBER : 03104324

APPLICANT : HITACHI CHEM CO LTD;

INVENTOR : YAMAMOTO HIROYUKI;

INT.CL. : C07K 3/08 C12P 21/00

TITLE : INSOLUBILIZING PROTEIN CONTAINING LYSINE AND TYROSINE AND  
INSOLUBILIZED PROTEIN

ABSTRACT : PURPOSE: To rapidly insolubilize the title marine protein useful as a biological adhesive without coloring by adding an oxidase, a crosslinking agent and ascorbic acid to a protein containing lysine and tyrosine.

CONSTITUTION: A marine protein containing lysine and tyrosine secreted from a hard-shelled mussel, etc., is incorporated with an oxidase (e.g. tyrosinase) and/or an organic crosslinking agent (e.g. glutaraldehyde) and L-ascorbic acid as a color protecting agent so that the protein containing lysine and tyrosine useful as a biological adhesive in vivo, etc., is insolubilized while suppressing coloring. The amount of L-ascorbic acid added is preferably 25-75mol% based on tyrosine residue and glyoxal, o-, m- or p-phthalaldehyde, etc., may be used as the crosslinking agent besides glutaraldehyde.

COPYRIGHT: (C) JPO

03969296

INSOLUBILIZING PROTEIN CONTAINING LYSINE AND TYROSINE AND INSOLUBILIZED PROTEIN

PUB. NO.: 04 -334396 [JP 4334396 A]  
PUBLISHED: November 20, 1992 (19921120)  
INVENTOR(s): YAMAMOTO HIROYUKI  
APPLICANT(s): HITACHI CHEM CO LTD [000445] (A Japanese Company or Corporation), JP (Japan)  
APPL. NO.: 03-104324 [JP 91104324]  
FILED: May 09, 1991 (19910509)  
INTL CLASS: [5] C07K-003/08; C12P-021/00  
JAPIO CLASS: 14.1 (ORGANIC CHEMISTRY -- Organic Compounds); 14.5 (ORGANIC CHEMISTRY -- Microorganism Industry)  
JOURNAL: Section: C, Section No. 1046, Vol. 17, No. 180, Pg. 26, April 08, 1993 (19930408)

ABSTRACT

PURPOSE: To rapidly insolubilize the title marine protein useful as a biological adhesive without coloring by adding an oxidase, a crosslinking agent and ascorbic acid to a protein containing lysine and tyrosine.

CONSTITUTION: A marine protein containing lysine and tyrosine secreted from a hard-shelled mussel, etc., is incorporated with an oxidase (e.g. tyrosinase) and/or an organic crosslinking agent (e.g. glutaraldehyde) and L-ascorbic acid as a color protecting agent so that the protein containing lysine and tyrosine useful as a biological adhesive in vivo, etc., is insolubilized while suppressing coloring. The amount of L-ascorbic acid added is preferably 25-75mol% based on tyrosine residue and glyoxal, o-, m- or p-phthaladehyde, etc., may be used as the crosslinking agent besides glutaraldehyde.

特開平4-334396

(43) 公開日 平成4年(1992)11月20日

(51) IntCl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 3/08		7731-4H		
C 1 2 P 21/00	A	8214-4B		

審査請求 未請求 請求項の数4(全 3 頁)

(21) 出願番号	特願平3-104324	(71) 出願人	000004455 日立化成工業株式会社 東京都新宿区西新宿2丁目1番1号
(22) 出願日	平成3年(1991)5月9日	(72) 発明者	山本 浩之 長野県上田市常田3丁目15番1号
		(74) 代理人	弁理士 若林 邦彦

(54) 【発明の名称】 リジン、チロシンを含むタンパク質の不溶化方法及び不溶化タンパク質

(57) 【要約】 (修正有)

【目的】 イガイ等が分泌する海洋性タンパク質を不溶化しても着色しないリジン、チロシン含有タンパク質の不溶化方法、及び酸化酵素チロシナーゼよりも安価でかつ安定性の高い添加剤を用いた系でのタンパク質の不溶化方法を提供する。

【構成】 リジン、チロシンを含むタンパク質に、酸化酵素及び／又は架橋剤、並びにアスコルビン酸を添加する。架橋剤としてはグルタルアルデヒド、グリオキザール、O-フタルアルデヒド、m-フタルアルデヒド又はP-フタルアルデヒドの少なくとも一種を添加する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 リジン、チロシンを含むタンパク質に、酸化酵素及び／又は架橋剤、並びにアスコルビン酸を添加することを特徴とするリジン、チロシンを含むタンパク質の不溶化方法。

【請求項2】 リジン、チロシンを含むタンパク質に、酸化酵素及び／又は架橋剤、並びにアスコルビン酸を添加して不溶化させた不溶化タンパク質。

【請求項3】 リジン、チロシンを含むタンパク質に、グルタルアルデヒド、グリオキザール、 $\alpha$ -フルタルアルデヒド、 $m$ -フルタルアルデヒド又は $p$ -フルタルアルデヒドの少なくとも一種を添加することを特徴とするリジン、チロシンを含むタンパク質の不溶化方法。

【請求項4】 リジン、チロシンを含むタンパク質に、グルタルアルデヒド、グリオキザール、 $\alpha$ -フルタルアルデヒド、 $m$ -フルタルアルデヒド又は $p$ -フルタルアルデヒドの少なくとも一種を添加して不溶化させた不溶化タンパク質。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、リジン (Lys)、チロシン (Tyr) を含むタンパク質の不溶化方法及び不溶化タンパク質に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 タンパク質、多糖類などの天然高分子化合物には、接着作用を示す化合物群が存在し、バイオテクノロジーな接着を指向する場合にはバイオ接着剤と呼ばれている。これらのバイオ接着剤は生成の段階では水溶性であり接着時に不溶化する。この種の接着剤は、生体適合性のある新素材として期待されている。その具体的な用途には医学 (内科、外科、眼科)、薬学、歯学、獣医学上での生体関連複合接着剤、水中での汚染防止のための表面被覆材料、あるいは導電性電子材料などが挙げられている。

【0003】 不溶化機構としてはタンパク質中の Tyr 残基が酵素チロシナーゼの酸化作用によってドーパ、ドーパキノンを経てキノン架橋する例や、ウルシオールが酵素ラッカーゼの酸化作用によってウルシオールキノンを経てさまざまな形の分子架橋を持つ高分子となる例がある。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 タンパク質が不溶化し、接着に関与する現象において、タンパク質中の Tyr 残基が酸化酵素の作用により Tyr  $\rightarrow$  Dop  $\rightarrow$  Dopキノンへと変化し、キノンと Lys 残基側鎖アミノ基の間にマイケル求核付加反応に伴う架橋が生ずる。この不溶化・接着機構を生体外の系で応用する場合、次の2点の問題点がある。第1に、Tyr 残基の酸化に伴いタンパク質が茶褐色に着色し、医学 (眼科)、歯学等で使用する場合に難点がある点である。第二は、酸化の

の酸化酵素チロシナーゼは失活の危険があり、かつ、高価である点である。

【0005】 本発明は不溶化しても着色しない Lys、Tyr 含有タンパク質の不溶化方法、及び酸化酵素チロシナーゼよりも安価でかつ安定性の高い添加剤を用いた系でのタンパク質の不溶化方法を提供するものである。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】 本願の第一の発明は、Lys、Tyr を含むタンパク質に、酸化酵素及び／又は架橋剤、並びにアスコルビン酸を添加して Lys、Tyr を含むタンパク質を不溶化させるものである。

【0007】 本願の第二の発明は、Lys、Tyr を含むタンパク質に、グルタルアルデヒド、グリオキザール、 $\alpha$ -フルタルアルデヒド、 $m$ -フルタルアルデヒド又は $p$ -フルタルアルデヒドの少なくとも一種を添加して Lys、Tyr を含むタンパク質を不溶化させるものである。

【0008】 Lys、Tyr を含むタンパク質としては、例えばイガイ等が分泌する海洋性タンパク質がある。酸化酵素としては、チロシナーゼ、フェノールオキシターゼ、チロシンヒドロキシラーゼ、ウルシオール等が使用される。架橋剤としては、グルタルアルデヒド、グリオキザール、 $\alpha$ -フルタルアルデヒド、 $m$ -フルタルアルデヒド又は $p$ -フルタルアルデヒド等のアルデヒド類の少なくとも一種が使用される。アスコルビン酸は、L-体、D-イソ体、DL-体が使用される。

【0009】 以下、本発明を具体例で説明する。Lys、Tyr を含むタンパク質を側鎖保護 Lys および Tyr を N-カルボキシ無水物法でランダム共重合したのち脱保護して合成した。モノマー仕込み量のモル比を Lys : Tyr = x : 1 (x = 1, 2, 5, 10) として合計4種類のポリマーを得た。水系溶媒中のタンパク質に、チロシナーゼを加えた系及びチロシナーゼと L-アスコルビン酸を加えた系の粘度測定を行い、不溶化の現象および着色について検討した。測定溶媒として模擬海水を希釈した 1/5 海水を用いた。

【0010】 合成タンパク質の平均分子量 (Mw) および平均重合度 (Dp) を粘度から推定した結果は次の通りであった。

X = 1, Mw: 64000, Dp: 250

X = 2, Mw: 124000, Dp: 450

X = 5, Mw: 95000, Dp: 350

X = 10, Mw: 95000, Dp: 360

【0011】 タンパク質にチロシナーゼを加えた系は時間と共に粘度が上昇した。さらにタンパク質にチロシナーゼとアスコルビン酸を加えた系の時間による粘度変化を図1に示す。タンパク質にチロシナーゼを加えた系では粘度上昇に伴って着色し80時間後には濃い茶褐色を示した。L-アスコルビン酸を 3mg (Tyr 残基に対して 25モル%) 加えた系では着色防止剤を加えない系

と同様に粘度上昇に伴って着色し80時間後には薄い茶褐色を示した。着色防止剤L-アスコルビン酸を6mg (Tyr残基に対して50モル%) 加えた系で粘度上昇を示したが着色を示さず80時間後も完全に無色透明であった。L-アスコルビン酸の添加量は、Tyr残基に対して25モル%から着色防止の効果が顕著に認められ、Tyr残基に対して50モル%でその効果が最高となる。75モル%以上添加すると着色防止の点では問題はないが不溶化反応を阻害する傾向が認められる。従って、L-アスコルビン酸の添加量は、Tyr残基に対して25モル%から75モル%が好ましい。

【0012】次にタンパク質に有機架橋剤を加えた系の時間による粘度変化の測定を行った。タンパク質にリシンの架橋剤として知られているジチオビス(スルホスクシンイミジルプロピオネート)を加えた系の時間による粘度変化の測定を行ったが、粘度上昇を示さず有効では

なかった。次いでタンパク質にグルタルアルデヒドを加えた系の時間による粘度変化の測定を行ったが、ゲル状の沈殿物を生じ粘度測定が不可能であった。タンパク質にグルタルアルデヒドを加えた系を静置すると全体がゲル化した。約40時間で完全なゲルとなった。

【0013】

【発明の効果】アスコルビン酸は、生体内で無害な添加剤であり、本発明によりタンパク質をバイオ接着剤として生体内利用するときの一つの障害を克服できた。有機架橋剤による架橋不溶化反応は、有機架橋剤が安価であること、反応が速く進行すること、酵素のように失活を恐れる必要が無いこと、などの利点がある。

【0014】

【図面の簡単な説明】

【図1】タンパク質にチロシナーゼとアスコルビン酸を加えた系の時間による粘度変化を示すグラフである。

【図1】

